

201432013A

厚生労働科学研究委託費

再生医療実用化研究事業

特定細胞加工物／再生医療等製品の品質確保に関する研究

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務主任者 新見伸吾

平成 27 (2015) 年 3 月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託事業による委託業務として、新見伸吾が実施した平成26年度「特定細胞加工物/再生医療等製品の品質確保に関する研究」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）

特定細胞加工物/再生医療等製品の品質確保に関する研究	1
新見 伸吾	

II. 委託業務成果報告（業務項目）

1. 一般的な滅菌・濾過滅菌等の無菌化手法の適用が困難な細胞加工物の製造における無菌操作、バリデーション、環境モニタリング、清浄化等を通じた無菌性保証及び工程等の微生物等汚染リスク低減のあり方に関する研究	291
紀ノ岡 正博	
2. 細胞加工物等の不均質性、運搬・輸送時の脆弱性、実生産における変動要因等を勘案した製品・原料資材の規格及び試験検査のあり方に関する研究	313
佐藤 陽治	

III. 学会等発表実績	329
--------------------	-----

IV. 研究成果の刊行物・別刷り

I. 委託業務成果報告（総括）

厚生労働科学研究委託費（再生医療実用化研究事業）

委託業務成果報告（総括）

特定細胞加工物／再生医療等製品の品質確保に関する研究

業務主任者 新見伸吾 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 部長

担当責任者 佐藤陽治 国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 部長

担当責任者 紀ノ岡正博 大阪大学 大学院工学研究科 教授

研究要旨

特定細胞加工物／再生医療等製品（以下、細胞加工物等という）の製造工程における無菌性保証及び品質確保については未知・未経験の要素が多い。本研究においては、細胞加工物等について、無菌性保証及び工程等の微生物汚染リスク低減のあり方、変動要因を勘案した品質確保のあり方について、提言及び取り纏めを行い、運用教育の活用、細胞加工物等の実用化促進に貢献することを目的として検討を行っている。

無菌性保証及び工程等の微生物汚染リスク低減のあり方に関する研究では、以下の検討を行った。無菌性保証のあり方について、全体会議を開催し、細胞加工物等における無菌操作法に対するガイドラインの趣旨、今後の進め方について意見交換を行った。また、細胞培養加工施設(CPF; Cell Processing Facility)の性能を評価した。CPFの操作室に設置された安全キャビネット(BHC; Biohazard Cabinet)について、操作室からBHC内及びBHC内から操作室への空気の漏洩を調べた結果、両者において漏洩は観察されなかった。着衣室に薄型クリーンユニット(ACP; Air Clean Partition)を設置し、故意に空中に粒子を拡散させ、ACPの使用及び不使用時における清浄度の回復度について検討した。その結果、ISOクラス7まで清浄度が回復するまでの時間は、ACPを用いない場合は2分ほどであったのに対し、ACPを用いると30秒以内であった。なお、風量・室圧を変化させて非作業時及びBHC停止条件における操作室の粒子清浄度を測定した結果、全条件においてISOクラス7で設定された規格値以内であった。以上の結果から、細胞加工物等における無菌操作法の考え方について実験を通して提示する場合に、本CPF施設は使用可能な性能を有していることが示された。

製造・流通上の変動要因等を考慮した製品・原材資材の規格及び試験検査のあり方に関する研究では、以下の検討を行った。品質確保のあり方について、品質に影響を与えると想定される変動要因のモデルケースとしてiPS細胞の培養維持期におけるゲノム不安定性を指標として、その評価方法の検討を行った。フィーダーフリー環境下で約3か月間培養し、3継代毎に回収したゲノムについて検討を行った結果、濃度及び純度の品質検定で問題が無いと判断された。また、本ゲノムを用いて作成したライブラリーの品質についても、

クローニングサイズ、1 検体当たりのペアエンドリード数及びクオリティスコアの観点から品質が良好であると判断された。これらの結果から、調製したゲノムは、今後全エクソン解析、CGH マクロアレイ解析、ビーズアレイ解析に供することが可能であることが示された。また、18 継代培養した iPS 細胞の核型を解析した結果、大半の細胞において染色体が異常であることが示され、どの段階で異常が起こったかを検討することが今後の課題となった。

さらに、再生医療に関する日本の省令および通知等の内容を広く海外に発信し、情報交換することを目的として、①厚生労働省令第九十三号 再生医療等製品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令、②厚生労働省告示第 375 号 生物由来原料基準、③平成 26 年 10 月 9 日付 薬食監麻発 1009 第 1 号 再生医療等製品に係る「薬局等構造設備規則」、「再生医療等製品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令」及び「医薬品、医薬部外品、化粧品及び再生医療等製品の品質管理の基準に関する省令」の取扱いについての英訳版を作成した。

A. 研究目的

再生医療は、病気やけがで機能不全になった組織、臓器を再生させる医療であり、現在不可能とされる疾患の画期的な根本治療の路を開くことが期待されている。一方、再生医療の歴史は新しいため未知・未経験な要素が多く、生きた細胞を用いる点で従来の医薬品と比べてはるかに複雑なため、治療に用いる特定細胞加工物／再生医療等製品（以下、細胞加工物等という）については本格的な実用化に至るまでのプロセスで、有効性、品質及び安全性の観点から解決すべき課題は多い。例えば、無菌医薬品と異なり、現状において細胞加工物等は一般的な滅菌、無菌化が実施できない、製造スケールが小さい、製品の種類が多岐にわたる、製造設備に関する新技術（自動化等）も開発されつつある、などの特徴がある。したがって、最終的な滅菌ができない医薬品の基準として「無菌操作法による無菌医薬品の製造に関する指針」（平成22年度厚生労働科学研究）（資料1）は適応できず、これらの細胞加工物等に特有の特徴を加味

した上で、エビデンスを収集し、これら製品の無菌性保証に関する新たなガイドラインを作成することが必要とされている。また、細胞加工物等の製造工程における均質性、安定性など品質の一定性確保に関しては、品質試験も含め未知の要素が多いため、一定の品質規格を有する細胞加工物等の提供には、これらを解明し製造工程での重要品質管理パラメータを導く手法を見出すことが必要となる。このように、細胞加工物等の品質を確保するには、実態把握及びエビデンス集積の一層の充実を図り、その特性等を踏まえた無菌性保証、製品・原料資材の規格及び試験検査、微生物等による汚染等リスクの低減等に係る基準を検討する必要がある。そこで、本研究課題は、
(1)一般的な滅菌・濾過滅菌等の無菌化手法の適用が困難な細胞加工物等の製造における無菌操作、バリデーション、環境モニタリング、清浄化等を通じた無菌性保証及び工程等の微生物等汚染リスク低減のあり方の提言ならびに運用教育への活用
(2)標記細胞加工物等の不均質性、運搬・輸

送時の脆弱性、実生産における変動要因等を勘案した製品・原料資材の規格及び試験検査のあり方の提言

を行い、これらの結果を取りまとめることにより、特定細胞加工物等の実用化および運用するための教育を促進することを目的として検討を行った。

本研究は、細胞加工物等における無菌操作法に関するガイドライン（案）作成、不均質性等の原因究明、製造工程における重要管理パラメータを設定する手法に関する考え方の提示等を通じて、細胞加工物の開発・市販化に大きく寄与することが期待される。

B. 研究方法

1. 一般的な滅菌・濾過滅菌等の無菌化手法の適用が困難な細胞加工物の製造における無菌操作、バリデーション、環境モニタリング、清浄化等を通じた無菌性保証及び工程等の微生物等汚染リスク低減のあり方に関する研究

1.1 ガイドライン作成

細胞加工物等における無菌操作法のガイドラインを作成するために会議を立ち上げた。『無菌操作法による無菌医薬品の製造に関する指針』をベースとし、再生医療等製品と医薬品製品の違いを議論しながら、企業専門家を主体として進めた。さらに、運用試験を取りまとめることで、運用教育へも活用を進めた。

1.2 無菌操作法に関する実験

細胞培養加工施設（CPF; Cell Processing Facility）に設置された、操作室（ISOクラス7）と安全キャビネット（BHC; Biohazard Cabinet）（ISOクラス5）及び操

作室に隣接した着衣室並びに脱衣室に対して実施した。

1.2.1 気流可視化評価

可視化しやすいように黒色の軟質ビニールシートを背景になるように貼付し、水蒸気を利用した気流可視化装置を用いて行った。操作室から BHC 内及び BHC 内から操作室への空気の漏えい、天井部に設置された給気口及び排気口における気流、正常な気流の動きを妨害する可能性のある種々のモデル操作条件において BHC 前面のシャッター開口部及び内部における気流の変化について検討を行った。

1.2.2 清浄度の評価

着衣室に薄型クリーンユニット（ACP; Air Clean Partition）を設置し、故意に空中に粒子を拡散させ、着衣室の ACP の使用及び不使用時における清浄度の回復度について測定した。また、非作業時、BHC 停止条件の操作室における清浄度について、風量と室圧を変化させて測定した。なお、粒子量は測定器（A2400LL, HACH）を用いて測定した。

2. 細胞加工物等の不均質性、運搬・輸送時の脆弱性、実生産における変動要因等を勘案した製品・原資材の規格及び試験検査のあり方に関する研究

2.1 iPS 細胞の培養

ヒト人工多能性幹細胞（hiPS 細胞）は理化学研究所バイオリソースセンターより購入した。購入した細胞株は 454E2 であった。hiPS 細胞の培養は、mTeSR1（STEMCELL Technologies 社）の基礎培地 400mL に、専用のサプリメント（5X Supplement）100mL を加え、0.1% ペニシリン/ストレプトマイ

シンを含む培地を調製し、マトリゲル (Corning 社) でコートされたディッシュを使用し、炭酸ガス濃度 5%、温度 37°C の条件下のもと培養を行った。細胞の継代は、細胞を D-PBS (-) で 2 回洗浄後、Dissociation Solution for human ES/iPS Cells 溶液 (ReproCELL 社) を添加し、37°C、炭酸ガスインキュベーターで 5 分程度加温し、hiPS 細胞のコロニーの周辺が剥がれかけた状態を確認後、D-PBS (-) で 3 回洗浄後、STEMPRO EZPassage (Life Technologies 社) を用いて hiPS 細胞のコロニーを剪断し、セルスクレーパーにて細胞を細胞塊が細かくならないように剥離し、遊離した細胞を回収した。マトリゲルコートディッシュ上に、適切な希釈割合で細胞塊を播種し、37°C、5%炭酸ガスインキュベーターで一晩培養を行い、翌々日から毎日 1 回、mTeSR1 で培地交換を行った。継代によるゲノム変異への影響を観察するために、0、3、6、9、12、15 継代目 (約 4 ヶ月間の培養) の hiPS 細胞を上述の方法で回収し、ゲノム抽出操作まで凍結状態で保存した。また、凍結融解がゲノム不安定性へ与える影響についても観察を行うために、ガラス化凍結法により hiPS 細胞の凍結を行った。液体窒素を発泡スチロールの容器に入れ、クリーンベンチの近くに準備した。クライオバイアルを凍結する本数準備し、細胞がサブコンフルエントの状態になるまで培養し、上述の方法にて細胞を回収した (60mm ディッシュでサブコンフルエントの細胞の場合、1~2 本のバイアルを準備)。このとき、複数本凍結する場合は、細胞ペレットを氷冷しておき、一本ずつ以下の操作を行った。StemCell Keep (Bio Verde 社) を 200 μ L 加え、良くピペッティ

ングし、ふたをしてなるべく早く (1 分以内が目安) バイアルごと液体窒素に浸漬し、液体窒素タンクで保存した。解凍操作は、37°C で暖めた培地を準備し、9mL の培地を入れた本数分の遠心管を用意し、凍結バイアルのふたをあげ、素早く 1mL の温めておいた mTeSR1 培地を添加し、ピペッティングして溶解した。9mL の培地の入った遠心管に全量を移し、遠心して洗浄を行い、マトリゲルコートディッシュ上に播種し、培養を上述の方法にて実施した。この時、10 μ M Y-27632 (和光純薬工業) を培地に添加した。以上の凍結融解時で得られた細胞を回収し、その後のゲノム抽出に供した。

2.2 iPS 細胞からのゲノム抽出

iPS 細胞からのゲノム抽出は、NucleoSpin Tissue (MACHEREY-NAGEL 社) を用いて行った。hiPS 細胞を回収し、Buffer T1 200 μ l に懸濁し、Proteinase K 溶液 25 μ l、Buffer B3 200 μ l を加え、70°C で 10~15 分間インキュベートした。96~100%エタノール 210 μ l を添加し、よく混合後、NucleoSpin Tissue Column に添加し、遠心した。Buffer BW 500 μ l をカラムに添加し、遠心後、Buffer B5 600 μ l をカラムに添加し、遠心を行った。70°C に温めた Buffer BE 100 μ l を加え、室温で 1 分間インキュベートした後、11,000 \times g で 1 分間遠心することによりゲノム抽出を行った。ゲノム量は NanoDrop (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて測定した。

2.3 核型解析

2.3.1 染色体標本作製

培地中に 300 μ g/ml でチミジンを添加し 16 時間同調培養を行った。PBS で洗浄し、チミジンリリース後 5 時間培養し、コルセ

ミドを $0.02 \mu\text{g/ml}$ 濃度で添加した。さらに 1 時間培養を行った後、トリプシンで細胞をはがして回収し、 0.075M KCl で 37°C 、20 分間低張処理し、メタノール：酢酸=3:1 の固定液で細胞を固定し、スライドグラスに広げた。

2.3.2 Qバンディング

$1 \mu\text{g/ml}$ 濃度のヘキスト 33258 溶液に染色体標本を 10 分間浸漬し、次いで $50 \mu\text{g/ml}$ のキナクリンマスタード液に 10 分間浸漬した。退色防止剤でマウントして蛍光で染色体画像を撮影した。

2.4 次世代シーケンサーを用いた Exome 解析

上記方法にて抽出された hiPS 細胞のゲノム DNA における Exon (CDS) 領域を濃縮し、次世代シーケンサーによるシーケンスを行ったのち、変異塩基を抽出した。ゲノム DNA の品質を濃度測定および電気泳動などにより確認後、 $5 \mu\text{g}$ 以上、 $100\text{ng}/\mu\text{L}$ 以上、 $\text{OD}260/\text{OD}280=1.6$ 以上、 $\text{OD}260/\text{OD}230=1.6$ 以上の純度を満たしたサンプルを使用した。サンプルを数百 bp に物理的に断片化を行い、二本鎖 DNA の両末端にアダプターを付加したフラグメントライブラリーを作製した。SureSelect Human All Exon V5 (アジレント・テクノロジー社) を用いて Exon (CDS) 領域を濃縮し、タグ配列を有するプライマーを用いて PCR 増幅を行い、シーケンスの鋳型となる DNA ライブラリーを作製した。HiSeq システム (イルミナ社) を用いて、100base 両末端のシーケンスを行い、5Gbase 相当のシーケンスデータを得た。シーケンスデータを参照ゲノム配列 (hg19) に対してマッピングし、ペア検体のマッピング情報から、体細胞変異塩基 (一塩基置換およ

び十数塩基程度までの挿入、欠失) を検出した。さらに遺伝子位置情報ならびに既知変異データベースを用いて、体細胞変異塩基位置をアノテーションした。

2.5 CGH アレイを用いたコピーナンバー変異 (CNV) 解析

Exome 解析に供したすべてのゲノム DNA について、CGH アレイを用いてシグナルデータを取得し、コピーナンバー変異をリスト化する解析を以下の通り実施した。ゲノム DNA の品質を濃度測定および電気泳動などにより確認後、 $2 \mu\text{g}$ 以上、 $100\text{ng}/\mu\text{L}$ 以上、 $\text{OD}260/\text{OD}280=1.8\sim 2.0$ 、 $\text{OD}260/\text{OD}230=1.0$ 以上の純度を満たしたサンプルを使用した。アジレント社推奨の方法に準じて標識ターゲット調製を行い、SurePrint G3 Human CGH $1\times 1\text{M}$ (Agilent 社) を用いてハイブリダイゼーション、スキャニング、シグナル数値化などのアレイ解析を行った。GenomicWorkbench ソフトウェアにてシグナル Raw データを解析し、その結果をレポートファイルにまとめ、コピーナンバー変異をリスト化した。

2.6 SNP アレイを用いた変異解析アレイ解析

Exome 解析に供したすべてのゲノム DNA について、SNP アレイを用いたゲノムタイピングを以下の通りに実施した。ゲノム DNA の品質を濃度測定および電気泳動などにより確認後、 $2 \mu\text{g}$ 以上、 $100\text{ng}/\mu\text{L}$ 以上、 $\text{OD}260/\text{OD}280=1.6$ 以上、 $\text{OD}260/\text{OD}230=1.6$ 以上の純度を満たしたサンプルを使用した。HumanOmni2.5-8 BeadChip Kit (イルミナ社) を用いて、約 200 万塩基についてタイピングを行った。得られたデータを GenomeStudio により解析し、生殖細胞変異

塩基（一塩基置換）およびコピーナンバー変異を検出した。

3. 再生医療に関する日本の省令および通知等の英訳

①厚生労働省令第九十三号 再生医療等製品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令、②厚生労働省告示第 375 号 生物由来原料基準、③平成 26 年 10 月 9 日付薬食監麻発 1009 第 1 号 再生医療等製品に係る「薬局等構造設備規則」、「再生医療等製品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令」及び「医薬品、医薬部外品、化粧品及び再生医療等製品の品質管理の基準に関する省令」の取扱いについての英訳版作成を専門業者に委託した。

（倫理面への配慮）

ヒト由来の生体試料に関しては、試料提供者に一切不利益および危険性が伴わない、人権擁護を含めたインフォームドコンセントのもとに採取された試料を用いた。また、研究目的を含め、研究内容の倫理的、科学的妥当性について国立医薬品食品衛生研究所・研究倫理委員会による審査・承認を得た上で研究を実施した。

C. 研究結果

1. 一般的な滅菌・濾過滅菌等の無菌化手法の適用が困難な細胞加工物の製造における無菌操作、バリデーション、環境モニタリング、清浄化等を通じた無菌性保証及び工程等の微生物等汚染リスク低減のあり方に関する研究

1.1 ガイドライン作成

2015 年 2 月 9 日に開催した第一回全体会議の要旨は以下の通りである（資料 2～3）。ガイドライン作成班の背景説明が行われた。本ガイドラインは「無菌操作法による無菌医薬品の製造に関する指針」を参考にし、再生医療等製品の特性に応じた記載に変更して作成することが確認された。項目が設定され、項目ごとに主担当者が決められた。比較事項、議論が必要な事項、実験したい事項等をピックアップしつつ、文章案を作り上げることとされた。主担当者は個々の文章を議論して修正文章を 4 月 3 日までに篠塚氏に提出することとされた。

1.2 無菌操作法に関する実験

1.2.1 気流可視化評価

BHC の前面シャッター開口部は気流のバリアーにより遮断されており、操作室から BHC 内及び BHC 内から操作室への空気の漏洩はなかった（図 1）。

操作室においては天井部に設置されたファンフィルターユニット（FFU； Filter Fun Unit, HEPA フィルター（High Efficiency Particulate Air Filter）付の給気口）から清浄気流が供給され、天井部 2 箇所（図 2）の排気口で吸い込まれている。FFU 吹出し部から直接排気口へ向かう気流は無く、その他のエリアでも目視にて確認できるような乱れた気流はなかった（図 2）。パスボックス、インキュベーターの扉開閉時において、扉の動作により操作室内の雰囲気誘引された。遠心分離機の運転時、背面より噴出した排気が天井部まで上昇して、本来の気流に乱れが生じた。

BHC シャッター部のエアバリアは、作業員の腕、資材等の搬入時にも十分に機能していた。また、内部からの風も手元付近

と奥にある吸込み部を通じて吸われており、風のバリアーが形成された。しかしながら、それらの吸込み部をピペットの包装部や手などでふさぐと風流が乱れ、風のバリアーが弱まった(図3)。BHC内の気流は上流より下流へ作業室内中央を境目に前後吸込部に流れていた(図4)。

1.2.2 清浄度の評価

故意に粒子を拡散した場合における着衣室の清浄度は、ISOクラス7(1000個/cft付近)に回復するまでに通常では2分ほどかかるが、ACPを使うと30秒以内に回復した(図5)。

非作業時、BHC停止条件の操作室における清浄度は処理風量(m³/min)を13~28、圧力(Pa)を30~50に変化させた場合において、ISOクラス7(Grade B相当)に準じて設定された規格値である100個/cft以内を満たした(表1)。しかし、風量条件や測定位置により粒子濃度が減衰する時間は異なっていた。

2. 細胞加工物等の不均質性、運搬・輸送時の脆弱性、実生産における変動要因等を勘案した製品・原資材の規格及び試験検査のあり方に関する研究

2.1 HiSeq システム(イルミナ社)を用いたシーケンス解析

2.1.1 ゲノムDNAの品質評価

上述の方法にて培養されたiPS細胞におけるゲノム品質を評価するために、二本鎖DNAの量を測定した結果、最低1回はシーケンスを行える量を取得することができた(表2)。また、核酸定量・アガロースゲル電気泳動を行い、濃度及び純度の品質検定を行った結果、すべてのサンプルにおいて

問題が無いと判断された(表3、図6)。

2.1.2 ライブラリーの品質評価

品質確認を行ったゲノムDNAについて、SureSelect XT Human All Exon v5を用いてライブラリー作製を行い、それらライブラリーの品質をAgilent 2100 Bioanalyzerを用いて測定した結果、すべての検体においてクローニングサイズが約200bp長からなるライブラリーを作製することができた(図7)。さらに、一部の検体について、これらライブラリーを用いてシーケンスを行った結果、一検体あたりのペアエンドリード数が約5億個、総塩基数に換算すると約50Gb相当の配列がシーケンスされていることが確認できた(表4)。また、塩基配列をシーケンスするとき発生するエラー率を、以下の数式を用いてPhredクオリティスコアの値を算出した。

$$Q = -10\log_{10}p$$

その結果、Q30(シーケンスエラーが生じる確率が0.1%)のクオリティスコアが、いずれの検体についても90%以上であることが確認できた(表4)。

2.2 ビーズアレイ解析およびAgilent aCGH解析

各培養条件で回収されたiPS細胞におけるゲノムワイドなジェノタイプリングと(CNV; Copy Number Variant)の解析を行うために、それぞれのiPS細胞からゲノムDNAを回収し、核酸定量・アガロースゲル電気泳動を行い、濃度及び純度の品質検定を行った結果、すべてのサンプルにおいて問題が無いと判断し、これらをビーズアレイ解析に用いることとした。現在、Illumina Infinium LCG Quad Assay(Illumina, Inc.)のマニュアルプロトコールに従って、

HumanOmni2.5-8 v1.1を用いたSNP解析およびCNV解析を実施している。同様に、Agilent aCGH解析に供するためのDNAサンプルも問題なく精製することができ、現在、SurePrint G3 Human CGH マイクロアレイ 1×1 Mを用いて解析中である。

2.3 長期培養後における iPS 細胞の核型の評価

フィーダーフリー培養環境下で 18 継代培養された iPS 細胞の核型解析を、Q-Banding 法にて解析した結果、正常な核型を持つ細胞は、20 細胞あたり 2 細胞のみであり、大半の細胞において染色体が異常であることが観察された (図 8)。

3. 再生医療に関する日本の省令および通知等の英訳

①厚生労働省令第九十三号 再生医療等製品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令、②厚生労働省告示第 375 号 生物由来原料基準、③平成 26 年 10 月 9 日付薬食監麻発 1009 第 1 号 再生医療等製品に係る「薬局等構造設備規則」、「再生医療等製品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令」及び「医薬品、医薬部外品、化粧品及び再生医療等製品の品質管理の基準に関する省令」の取扱いについての英訳版を作成した(資料 4~6)。

D. 考察

1. 一般的な滅菌・濾過滅菌等の無菌化手法の適用が困難な細胞加工物の製造における無菌操作、バリデーション、環境モニタリング、清浄化等を通じた無菌性保証及び工程等の微生物等汚染リスク低減のあり方に関する研究

本会議においてガイドライン作成に向けた体制及び準備がほぼ整った。今後の会議において必要に応じて、無菌化工程のプロセスの専門家を追加する必要があるかもしれない。

無菌操作法に関する実験の気流可視化評価においては、操作室において FFU から供給された清浄な空気は徐々に室内に拡散し、排気口に吸い込まれることが示唆された。操作室内が汚染されている場合は、パスボックス、インキュベーターの開閉時に内部も汚染される可能性が示された。なお、開閉時において操作室内の気流がパスボックス及びインキュベーター内に影響を与えることはない。扉開閉部の扉の動作によるリスクについては、今後菌の散布試験等による検証を実施する予定である。遠心分離機については、使用上作業者の動線には該当せぬ位置ではあるが、設置場所、排気位置、方向には注意する必要がある。また、排気上スムーズに天井の排気口に流す配慮が望ましい。BHC 内における操作については気流吸込部を腕や資材で塞ぐことがないように操作手順書の策定や教育訓練の必要性が示された。資材は吸込部がない左右に配置して作業することが望ましいことが示された。

無菌操作法に関する実験の清浄度の評価においては、ACP の活用が清浄度の回復に有用となる場合があることが示された。人体から発生する粒子と生物学的な汚染の相関については、今後環境モニタリング等により検証していく予定である。操作室に粒子清浄度については適切であることが示された。今後は、実作業時の動線域における清浄度回復性能を考慮した換気回数の決定

方法を検討する予定である。操作室雰囲気
の誘引については、操作室への外気導入量
(OA; Outdoor Air) が少量のため、隣接す
る着衣室、脱衣室からの出入りの際に各室
からの発生が推定される。この問題は操作
室への OA 量の増加により改善可能である
が、初期費用、運転費用が増大する。OA 量
を増加させずに操作室と隣接する着衣室の
清浄度回復性能を向上させるには、教育指
導により、更衣後、粒子が落ち着いてから
操作室に入ることにより対応可能である。
または粘着テープにて着衣表面の粒子を減
少させた後、ガウニングを行うことも有効
と思われる。

2. 細胞加工物等の不均質性、運搬・輸送時 の脆弱性、実生産における変動要因等を勘 案した製品・原資材の規格及び試験検査の あり方に関する研究

細胞加工物等の品質に影響を及ぼすと想
定される要因は、製造工程内では多数存在
するため、本研究では、一つのモデルケー
スとして、細胞の継代および凍結融解のプロ
セスに着目し、細胞加工物等の品質の指
標となるゲノム不安定性について、次世代
シーケンサーなどを用いた解析により評価
をおこなった。製造工程の上流に位置する
iPS細胞（原材料でもある）を、多分化能を
維持したまま約4ヶ月間継代培養を行った
が、9割の細胞において、染色体の異常が観
察された。この異常のほとんどは、12番染
色体トリソミーであり、過去の報告からも
核型の異常としては主に12、17、20番染色
体またはX染色体の全体あるいは一部が増
幅する例が報告されており、通常の培養条
件下（研究方法参照）でも染色体の構造異

常が起こりうることが判明した。iPS細胞を
再生医療に使用するという観点からすると、
このような染色体異常が起こることは、極
めて重要な問題であり、培養の早い段階で
そのような異常を検出する必要があると考
えられる。本研究では、このiPS細胞につい
て、長期培養（18継代）の間起こったゲ
ノム変異について、3継代ごとの細胞に関す
る全エクソン解析、CGHマイクロアレイ解析、
ビーズアレイ解析のデータを収集する予定
であり、どの時点で染色体異常が起こった
のかが検証できると思われる。さらには、
今回のエキソーム解析は通常の読み深度
(Depth) よりも深く (50Gb相当の総塩基数)
シーケンスされているため、低頻度のゲノ
ム変異を検出することも可能であると考え
られる。即ち、ゲノム変異と染色体の構造
異常の相関が得られることが予想され、次
世代シーケンサーを用いたゲノム異常検出
系の確立にも、本研究成果は役立つものと
期待される。来年度は上述に掲げた予測を
もとに、正常核型をもつ細胞を含めた同様
の解析結果を収集し、次世代シーケンサー
を用いた細胞の品質評価系を検証していく
予定である。

3. 再生医療に関する日本の省令および通 知等の英訳

作成された英訳版は再生医療に関する日
本の規制情報についての情報発信及び情報
交換において有意義に使用されることが期
待される。

E. 結論

1. 一般的な滅菌・濾過滅菌等の無菌化手法
の適用が困難な細胞加工物の製造における

無菌操作、バリデーション、環境モニタリング、清浄化等を通じた無菌性保証及び工程等の微生物等汚染リスク低減のあり方に関する研究

再生医療等製品の無菌操作法に関するガイドライン作成を行うべく、各分野の専門家を集めた会議を立ち上げた。

CPC において、風量・換気回数、空間差圧の様々な条件検討や気流可視化試験、清浄度検証などを行った。今回の検証の結果、当 CPC は、今後行う予定の無菌性保証及び工程等の微生物汚染リスク低減のあり方を提言するための諸実験計画を行うのに適した性能を持つことが明らかになった。

2. 細胞加工物等の不均質性、運搬・輸送時の脆弱性、実生産における変動要因等を勘案した製品・原資材の規格及び試験検査のあり方に関する研究

フィーダーフリーの培養環境下で長期間（18継代）培養されたiPS細胞において、核型異常のある細胞が出現した。

高品質のシーケンスライブラリーを作製することができ、すべての検体において、50Gb相当のシーケンスを読むことができた。

現在、全エキソーム解析、CGHマイクロアレイ解析、ビーズアレイ解析が進行中であるため、次年度以降、これらすべての解析が完了後には、これまでのゲノム評価試験結果との比較検討を行い、簡便性、再現可能性、信頼性などについて総合的に評価することで、細胞加工物等におけるゲノム不安定性を指標にした場合の標準的な方法論を提案する予定である。

3. 再生医療に関する日本の省令および通

知等の英訳

①厚生労働省令第九十三号 再生医療等製品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令、②厚生労働省告示第 375 号 生物由来原料基準、③平成 26 年 10 月 9 日付薬食監麻発 1009 第 1 号 再生医療等製品に係る「薬局等構造設備規則」、「再生医療等製品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令」及び「医薬品、医薬部外品、化粧品及び再生医療等製品の品質管理の基準に関する省令」の取扱いについての英訳版を作成した。

F. 健康危険情報

特に無し

G. 研究発表

1. 論文発表

(論文及び総説)

1. Kono K, Takada N, Yasuda S, Sawada R, Niimi S, Matsuyama A, Sato Y. Characterization of the cell growth analysis for detection of immortal cellular impurities in human mesenchymal stem cells. *Biologicals*. 2015, 43: 146-149
2. Kusakawa S, Machida K, Yasuda S, Takada N, Kuroda T, Sawada R, Okura H, Tsutsumi H, Kawamat H, Sato Y. Characterization of in vivo tumorigenicity tests using severe immunodeficient NOD/Shi-scid IL2Rgamma null mice for detection of tumorigenic cellular impurities in human cell-processed therapeutic

- products. *Regen Ther.* 2015, 1: 30-37
3. Tano K, Yasuda S, Kuroda T, Saito H, Umezawa A, Sato Y. A novel in vitro method for detecting undifferentiated human pluripotent stem cells as impurities in cell therapy products using a highly efficient culture system. *PLoS One.* 2014, 9: e110496.
 4. Kuroda T, Yasuda S, Sato Y. In vitro detection of residual undifferentiated cells in retinal pigment epithelial cells derived from human induced pluripotent stem cells. *Methods Mol Biol.* 2014, 1210: 183-192.
 5. 岡野清, 川俣治, 左海順, 菅原敬信, 殿森俊介, 新見伸吾, 藤江江里. 第2章 バイオ医薬品の安全性確保 ②ウイルス迷入の安全性評価. *PHARM TECH JAPAN.* 2014, 30: 57-63
 6. 佐藤 陽治. ヒト多能性幹細胞加工製品に残存する未分化多能性幹細胞の高感度検出法の開発. *再生医療.* 2014, 13: 432-436
 7. 三浦 巧, 佐藤 陽治. 再生医療・細胞治療に使用する細胞加工物の品質・安全性評価の原則と造腫瘍性の考え方. 谷本 学校毒性質問箱. 2014, 16: 1-10
 8. 中島 啓行, 佐藤 陽治. 薬事法改正と再生医療等安全性確保法を踏まえた再生医療/細胞治療の開発. *PHARM STAGE.* 2014, 14: p1-5
 9. 村岡 ひとみ, 佐藤 陽治. 再生医療・細胞治療の規制動向とレギュラトリーサイエンス. *日本DDS学会誌.* 2014, 29: 207-216
2. 学会発表
 1. 佐藤謙一, 新見伸吾, 他 19 名. 再生医療の最近の話題と規制動向 日本 PDA 製薬学会第 21 回年会, 東京 (2014 年 12 月 2~3 日)
 2. 水谷 学, 紀ノ岡 正博. 再生医療における微生物管理の現状 日本 PDA 製薬学会 第 4 回微生物シンポジウム「最新の迅速微生物測定法」, 東京 (2014 年 11 月 27 日)
 3. 紀ノ岡 正博, 培養工学観点から見た iPS 細胞培養技術の展開 第 14 回日本再生医療学会総会 特別シンポジウム 「細胞加工における新技術」, 横浜 (2015 年 3 月 21 日)
 4. Sato Y. Tumorigenicity. IABS - International Regulatory Endeavour Towards Sound Development of Human Cell Therapy Products, 東京 (2015 年 2 月 18~19 日)
 5. 佐藤 陽治 細胞技術の許認可の実情—再生医療に関する日本の新しい規制の枠組み—. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会, 東京 (2014 年 11 月 17~18 日)
 6. Sato Y. Japanese Regulations for Quality and Safety of Regenerative Medicine and Cell Therapy. 11th Annual Meeting DIA Japan 2014, 東京 (2014 年 11 月 16~18 日)
 7. 佐藤 陽治 ヒト由来移植細胞に混入する多能性細胞・造腫瘍性細胞の検出法の性能評価. 第 87 回日本生化学会大会, 京都 (2014 年 10 月 15~18 日)

8. 佐藤 陽治 再生医療に関する日本の新しい規制の枠組み. RAPS Japan (Regulatory Affairs Professionals Society of Japan) 再生医療プレミアムワークショップ「再生医療・再生医療等製品のレギュラトリーサイエンス」, 東京 (2014年10月29日)
9. 萩原衆子, 山本誠司, 吉田徳幸, 佐々木澄美, 飯村信, 小泉誠, 佐藤陽治, 植村英俊, 井上貴雄. オリゴ核酸による自然免疫活性化の評価法に関する研究. アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム2014, 東京 (2014年9月8~9日)
10. 佐々木澄美, 吉田徳幸, 内田恵理子, 佐藤陽治, 井上貴雄. siRNAの細胞内取り込み機構の解析. 第6回日本RNAi研究会, 広島(2014年8月28~30日)
11. Uchida E, Igarashi Y, Sato Y, Onodera M, Yamaguchi T. Study on the biosafety of ex vivo transduced cells with retroviral vectors and Cartagena protocol domestic law. 第20回日本遺伝子治療学会学術集会, 東京 (2014年8月6~8日)
12. Suresh T, Maekawa K, Saito Y, Sato Y, Suzuki T. Individual Variations in the Human Urinary Proteome in Relation to Rats. The 3rd International Congress on Personalized Medicine, プラハ (2014年6月26~29日)
13. Kuroda T, Tachi S, Yasuda S, Kusakawa S, Sato Y. Profiling of Human Induced Pluripotent Stem Cell Lines for Predicting The Differentiation Propensity. ISSCR 12th Annual Meeting, バンクーバー (2014年6月18~21日)
14. 佐藤 陽治 再生医療・細胞治療に関する国内外の規制動向. 医療機器レギュラトリーサイエンス研究会 第9回研究会, 東京 (2014年6月6日)
15. Tano K, Yasuda S, Umezawa A, Sato Y. A highly efficient culture method for growth and detection of undifferentiated human pluripotent stem cells present as impurities in cell-processed therapeutic products. International Society for Cellular Therapy 2014, パリ (2014年4月23~26日)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

担当協力者

篠塚 より子 大阪大学 大学院工学研究科 研究員

三浦 巧 国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 第1室長

西田 幸二 大阪大学 大学院医学研究科 教授

櫻井 信豪 独立行政法人医薬品医療機器総合機構 品質管理部 部長

鳴瀬 諒子 独立行政法人医薬品医療機器総合機構 品質管理部 調査役



BHC OFF

BHC ON

図1 BHC 外部の風のバリアー

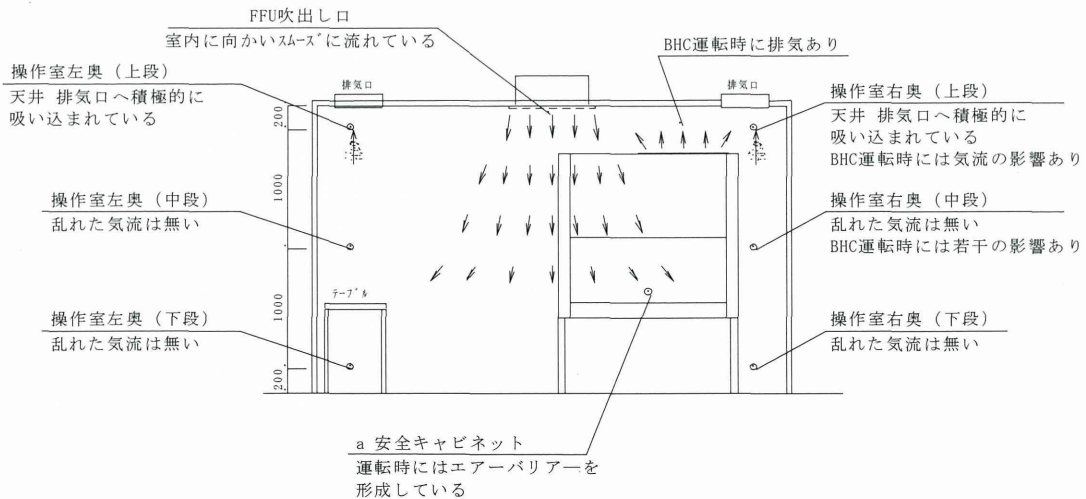
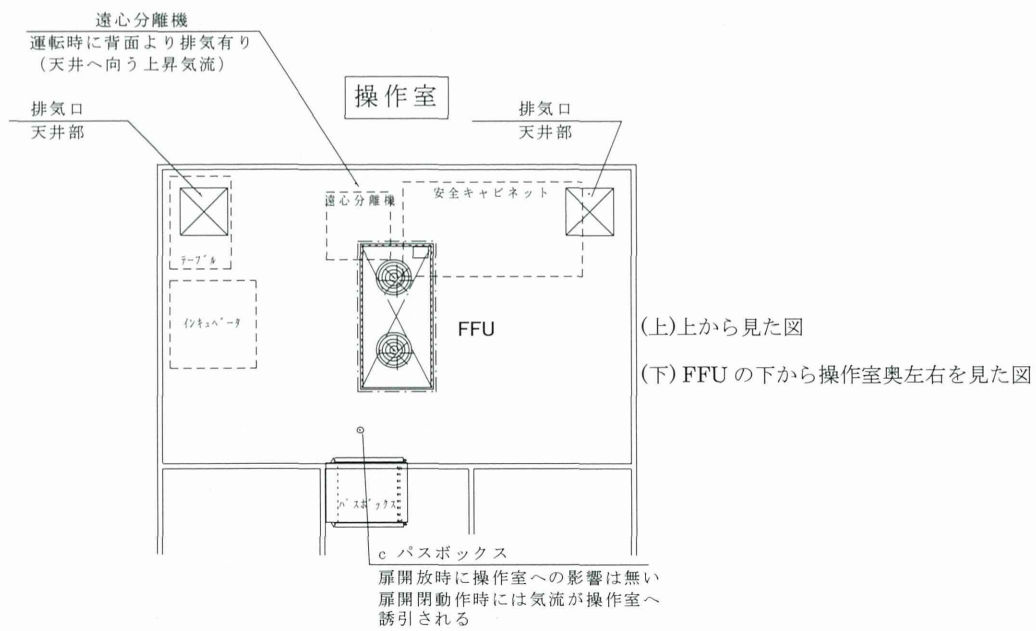
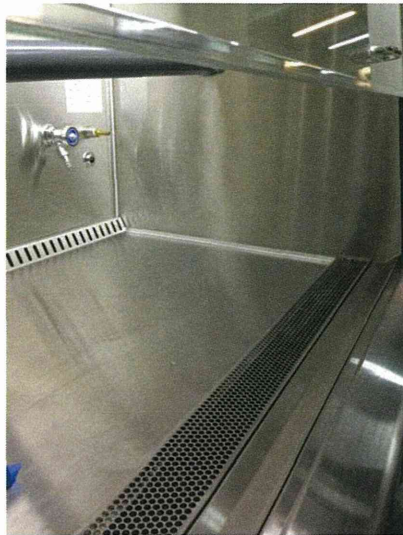


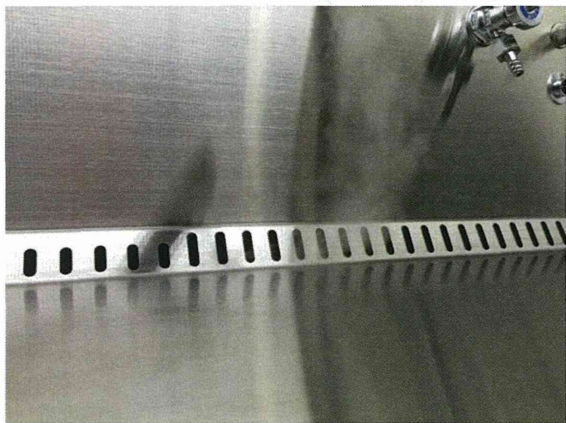
図2 風速測定位置(FFU 取付位置)と排気口、操作室における気流の流れ(推定)



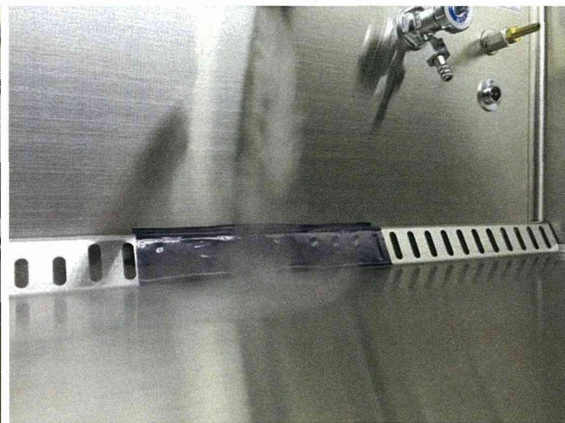
BHC 全面吸込部 正常運転中



腕で吸込部を塞いだ時



BHC 奥側吸込部 正常運転中



テープにて吸込部を防いだ状態(テープ幅 200mm)

図 3 BHC 内における気流吸込部確保の重要性

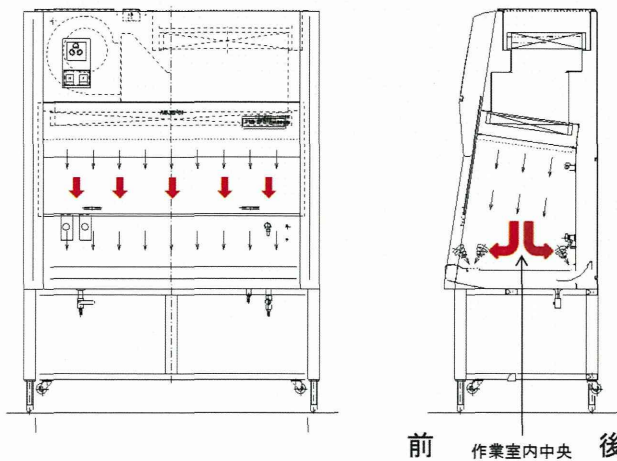


図 4 BHC 内における気流の流れ (左:正面図、右:側面図)

測定前条件

着衣室に1名入室し、ガウニングを想定した屈伸運動を20秒程度行い、その直後に退出し、測定を開始した。

1. 測定条件

条件①: 薄型ファンフィルターユニット(ACP) 停止

条件②: 薄型ファンフィルターユニット(ACP) 運転

ACP 運転時 6.5m³/min、天井吹出 3m³/min と合わせ循環回数 124 回/H

着衣室の総風量=6.5(ACP)+3(FFU)=9.5m³/min

換気回数=9.5 m³/min ÷ 4.6 m³(部屋内容積) × 60sec = 124 回/H

ACP 停止時、天井吹出 3m³/min、循環回数 39 回/H

対象粒径: 0.5 μm 以上粒子

吸引量 1cft/min 測定時間 10sec

測定インターバル 10sec

(10sec 当たりの吸引量 0.166cft)

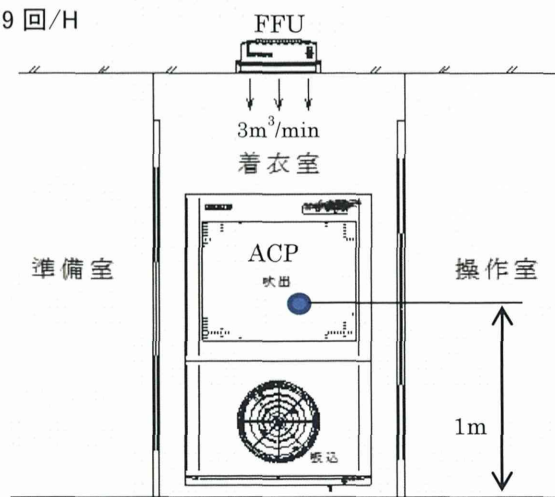
2. 測定位置

着衣室中央部 測定高さ床より+1m

3. 測定器

メーカー: HACH、型式: A2400LL

製造番号: 080101003



測定概念図

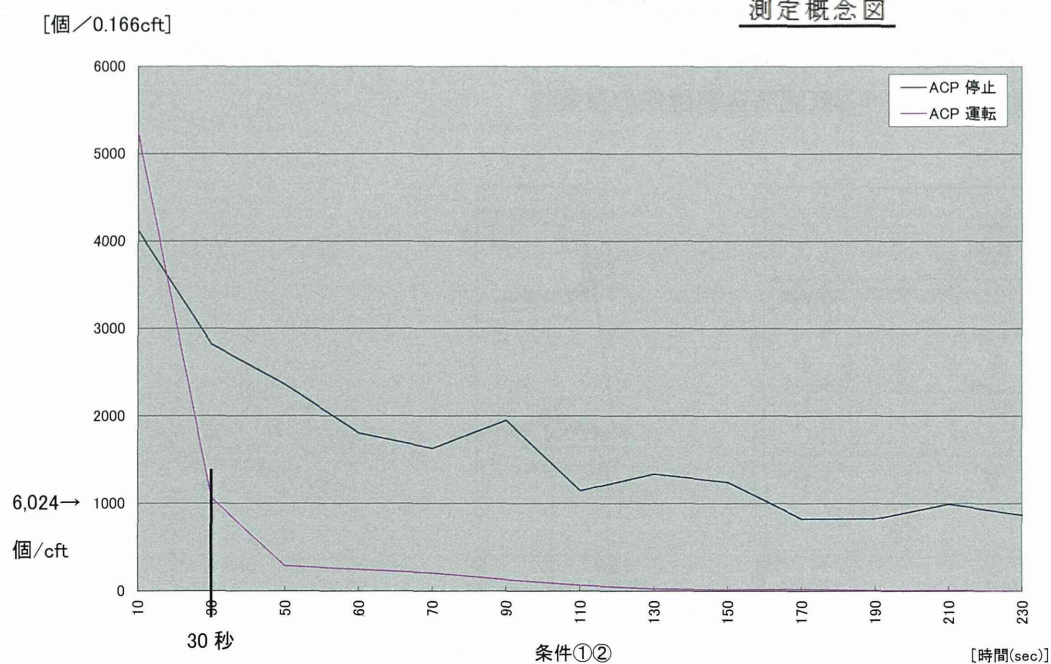


図5 着衣室 清浄度回復性能試験